

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

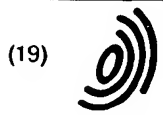
Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



B18

(11) EP 0 696 642 A1

(12) EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
14.02.1996 Patentblatt 1996/07

(51) Int. Cl.⁶: C12Q 1/56

(21) Anmeldenummer: 95111554.2

(22) Anmeldetag: 22.07.1995

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB IT LI LU NL PT SE

(71) Anmelder: BEHRINGWERKE Aktiengesellschaft
D-35001 Marburg (DE)

(30) Priorität: 08.08.1994 DE 4427785

(72) Erfinder: Kraus, Michael, Dr.
D-35041 Marburg (DE)

(54) Verfahren zum Nachweis von Störungen des Protein C/Protein S-Systems

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Störungen des Protein C/Protein S-Systems durch ein Verfahren zum qualitativen Nachweis und zur quantitativen Bestimmung der funktionellen Aktivität des Protein C/Protein S-Systems der Gerinnung in einer Probe einer biologischen Flüssigkeit, das folgende Schritte einschließt:

- a) Zugabe eines Aktivators des Protein C zu der verdünnten oder unverdünnten Probe;
- b) optionale Zugabe eines Kontakthaseaktivators;
- c) Inkubation des Reaktionsansatzes;
- d) Start des Gerinnungsablaufes durch Zugabe von Kalziumionen und/oder anderen Gerinnungs-auslösenden Agenzien und
- e) Bestimmung der Gerinnungsaktivität.

EP 0 696 642 A1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Störungen des Protein C/Protein S-Systems.

Das Protein C/Protein S-System stellt einen wichtigen antikoagulatorischen Mechanismus dar. Im Normalfall stehen
 5 die koagulatorischen und antikoagulatorischen Mechanismen der Gerinnung in einem ausgewogenen Verhältnis zu einander.

Die Aktivierung der Gerinnung mündet in der Umsetzung des Proenzym Prothrombin zur aktiven Protease Thrombin. Thrombin beschleunigt seine Entstehung selbst, in dem es die Kofaktoren Faktor V und Faktor VIII durch proteolytische Spaltung aktiviert. Diese aktivierten Kofaktoren bilden mit den Proteasen Faktor Xa bzw. IXa aktive
 10 Enzym/Kofaktor-Komplexe auf Phospholipidoberflächen, deren Aktivität um den Faktor ca. 1000 höher ist als die der singulären Proteasen. Durch diese positive Rückkopplung kommt es quasi explosionsartig zur Entstehung großer Mengen an Thrombin. Thrombin setzt Fibrinogen zu Fibrin um, das im Normalfall zum Wundverschluß und zur Wundheilung führt. Um eine lebensbedrohende Ausweitung der Gerinnung zu verhindern, die zu einem Verschluß des Gefäßsystems im Körper, also zu Thrombosen führen würde, müssen sowohl die aktive Protease als auch die Nachlieferung der Protease unterbunden werden. Aktive Proteasen werden im Körper durch Protease-Inhibitoren durch die Ausbildung kovalenter Komplexe neutralisiert. Die Unterbrechung des Nachschubes wird durch Thrombin selbst initiiert. Thrombin bindet
 15 hierzu an das Membranprotein Thrombomodulin und setzt das Proenzym Protein C (PC) zur aktiven Protease Protein Ca (APC) um. APC seinerseits bildet mit dem Kofaktor Protein S (PS) einen Komplex, der die aktiven Kofaktoren Faktor VIIIa und Faktor Va proteolytisch spaltet und dadurch inaktiviert. APC unterbricht somit die starke Stimulierung durch diese Kofaktoren.

Die Bedeutung des Protein C/Protein S-Systems wird dadurch bestätigt, daß Personen mit erblichen oder erworbenen Mängeln oder Defekten an Protein C und/oder Protein S mit hoher Wahrscheinlichkeit Thrombosen, insbesondere rezidivierende venöse Thrombosen, erleiden (Esmon, C.T., TCM 2: 214-219, 1992). Neben Protein C und Protein S können weitere Faktoren die Aktivität des Systems beeinflussen, so von Willebrand Faktor und Faktor IXa (Rick, M.E.
 25 et al., J. Lab. Clin. Med. 115: 415-421, 1990), die Faktor VIIIa vor proteolytischem Abbau schützen können. Erworbene Störungen können auch auf die Entstehung von Lupus anticoagulants zurückgehen. Dies sind gegen Phospholipide gerichtete Antikörper, die die zur Funktion notwendige Anbindung der Protease/Kofaktor Komplexe an Phospholipid-Oberflächen stören (Amer, L. et al., Thromb. Res. 57: 247-258, 1990). Schließlich wurde in jüngster Zeit eine Mutation des Faktors V beschrieben, der nicht mehr oder zumindest nur sehr schlecht durch APC inaktiviert werden kann (Bertina, R.M. et al., Nature 369: 64-67, 1994).

Aufgrund der vielen möglichen Störungen des für seine antithrombotische Wirkung wichtigen Protein C/Protein S Systems, ist es in der klinischen Diagnostik sinnvoll, einen Screening Test anzuwenden, der eine Störung in diesem System generell anzeigt. Dies gilt insbesondere dann, wenn bestimmte Störungen, wie in diesem Fall durch von Willebrand-Faktor, Faktor IXa, Lupus anticoagulant oder die Mutation des Faktors V, nur unter großem Aufwand in speziell
 35 darin erfahrenen Labors analysiert werden können. Darüber hinaus kann ein Screening Test, der das Prinzip der Wirkung des Protein C/Protein S Systems nutzt, auch Störungen anzeigen, deren Ursachen derzeit noch nicht bekannt sind.

Bisher wurden Protein C oder Protein S als Einzelfaktoren auf ihre Funktionalität untersucht. Hierzu wird die Probe oder aus der Probe isoliertes Protein C zunächst im Unterschuß zu einem Protein C-Mangelplasma zugesetzt. Die Aktivierung des Protein C erfolgt anschließend entweder durch Zusatz von Thrombin oder Thrombin und Thrombomodulin oder durch Zugabe eines Schlangengifts von *Agkistrodon contortrix*, das unter dem Handelsnamen Protac® (Fa.
 40 Pentapharm, Basel, Schweiz) bekannt ist. Die Detektion des in der Probe vorhandenen Protein C erfolgt entweder anhand der Verlängerung der Gerinnungszeit durch den antikoagulatorischen Effekt des in der Probe vorhandenen Protein C oder durch Umsetzung eines für Thrombin spezifischen Substrats. Alternativ kann durch die Verwendung eines spezifischen Substrats für APC die Protein C-Aktivität nach Aktivierung mit Thrombin oder Protac® auch direkt chromogen bestimmt werden.

Die Protein S Bestimmungen erfolgen durch Mischung der Probe mit PS-Mangelplasma. Die stimulierende Wirkung des Protein S auf die antikoagulatorische Aktivität von APC wird durch die Bestimmung der Verlängerung der Gerinnungszeit erfaßt. Das hierzu benötigte APC wird entweder zugegeben oder es wird mittels Protac® das Protein C im PS-Mangelplasma aktiviert. (eine Übersicht wird gegeben in Bertina, R. M., Res. Clin. Lab. 20: 127-138, 1990).

50 Die bisher beschriebenen Methoden sind nur dazu geeignet, Störungen des Protein C oder Protein S durch den jeweils singulär untersuchten Faktor zu detektieren. Sie eignen sich daher nicht als Screening Tests.

In einem weiteren Verfahren (Amer, L. et al., Thromb. Res. 57: 247-258, 1990) wird die aktivierte, partielle Thromboplastinzeit (APTT) modifiziert. Die APTT ist ein Standardverfahren zur Detektion von Gerinnungsstörungen, d.h. sie dient zur Erkennung von Blutungsneigungen. Nach Aktivierung des Probenplasmas mittels einer aktivierenden Oberfläche wird die Gerinnung bei Amer et al. durch gleichzeitige Zugabe von Calciumionen und APC gestartet. Die Gerinnungszeiten werden durch die antikoagulatorische Wirkung des exogen zugegebenen APC verlängert. Dieser Test erkennt somit bereits gewisse Störungen des Protein C/Protein S-Systems. Da APC exogen zugegeben wird, können
 55 allerdings Defekte oder Mängel des Protein C in der Probe nicht erkannt werden.

Basierend auf der Thromboplastinzeit, einem weiteren Standardverfahren in der Gerinnungsdiagnostik, aktivieren Duchemin, J. et al. (Thromb. Haemost. 71, 331-338, 1994) in einer Probe durch Zugabe von Thromboplastin und Calcium die Gerinnung. Das entstehende Thrombin aktiviert bei gleichzeitiger Zugabe von Thrombomodulin das Protein C in der Probe (endogen). In Abhängigkeit von der Funktionstüchtigkeit des Protein C/Protein S Systems wirkt APC der Entstehung von Thrombin entgegen. Nach 15 Minuten wird durch Komplexbildung der Calciumionen die weitere Gerinnungsaktivität unterbrochen und das entstandene Thrombin durch Umsatz eines spezifischen chromogenen Substrats bestimmt. Die entstandene Menge an Thrombin ist indirekt abhängig von der Funktionsfähigkeit des Protein C/Protein S-Systems.

Alle Störungen des Protein C/Protein S-Systems der Probe lassen sich erkennen, da das endogene Protein C aktiviert wird. Nachteilig ist jedoch insbesondere die lange Gesamtmeßzeit von 16 Minuten. Für einen routinemäßigen Einsatz als Screening Test ist eine solch zeitaufwendiger Test unvorteilhaft. Weiterhin werden mit Thromboplastin und Thrombomodulin zwei Membranproteine benötigt, deren Herstellung aufwendig und deren Stabilität, insbesondere bei Thrombomodulin, begrenzt ist. Schließlich wird in der Probe im ersten Schritt bereits ein Gerinnsel erzeugt, so daß dieses Verfahren nur in Kombination mit chromogenen Meßmethoden möglich ist, die den Umsatz dem erzeugten Thrombins trotz der Anwesenheit des Gerinnsels erfassen. Die traditionelle Meßmethodik, die die Entstehung des Fibringerinnsels erfaßt, ist damit nicht möglich.

Der vorliegenden Erfindung lag somit das technische Problem zugrunde, ein Verfahren bereit zu stellen, das geeignet ist, vollständig die Funktionalität des Protein C/Protein S-Systems zu erfassen und sowohl mit der traditionellen Meßtechnik - Erfassung der Entstehung eines Fibringerinnsels - als auch mit Hilfe von chromogenen Substraten, ausgewertet werden kann.

Die Lösung dieses technischen Problems erfolgt durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen.

Es wurde überraschenderweise festgestellt, daß Störungen des Protein C/Protein S-Systems in einem funktionellen Gerinnungstest nachgewiesen werden können, wenn durch Zusatz eines Protein C Aktivators zur Probe endogenes Protein C der Probe aktiviert wird, wodurch die Gerinnungszeit, vermutlich aufgrund des Abbaus der aktivierten Kofaktoren Faktor Va und Faktor VIIIa, im Normalfall verlängert wird. Eine geringer ausgeprägte Verlängerung der Gerinnungszeit deutet auf Störungen in diesem natürlichen anti-koagulatorischen System hin, weshalb dieser Test insbesondere auch als Screening Test geeignet ist.

Im erfindungsgemäßen Verfahren wird das endogene Protein C der Probe genutzt, um die Funktionalität des Protein C/Protein S Systems zu überprüfen. Der Test basiert auf einer Modifikation der APTT. Zunächst wird ein Protein C-Aktivator, Kontakphasen-aktivator, Phospholipide sowie die Probe in einem Testgefäß zusammengebracht und anschließend inkubiert. In dieser Phase werden, wie in der APTT üblich, die Proteasen Faktor XII, Präkallikrein und Faktor XI aktiviert. Zusätzlich wird durch den Protein C-Aktivator das endogene Protein C in der Probe aktiviert, das mit dem Protein S der Probe auf den Phospholipidoberflächen aktive APC/Protein S Komplexe ausbildet. Nach der Inkubation wird die Gerinnung durch Zugabe von Calciumionen ausgelöst und die entstandenen APC/Protein S-Komplexe verzögern die Gerinnselbildung wie oben bereits beschrieben.

Im Unterschied zu Duchemin et al. wird im erfindungsgemäßen Verfahren Protein C nicht durch das Thrombin der Probe aktiviert, sondern durch Zugabe eines Protein C Aktivators. Dies erlaubt, die Meßzeit wesentlich zu reduzieren. So genügen, wie im Beispiel 1 aufgeführt, bereits kurze Inkubationszeiten von 2 Minuten vollkommen, um eine Aussage über die Funktionsfähigkeit des Protein C/Protein S-Systems treffen zu können. Schließlich erfolgt die Detektion über die Bestimmung der Gerinnungszeit, so daß sowohl traditionell (Bestimmung des Einsetzens der Gerinnselbildung), als auch chromogen (Umsetzung eines chromogenen Substrats) messende Geräte verwendet werden können.

Im Gegensatz zu den früheren Verfahren zur Protein C oder Protein S Bestimmung wird die Probe nicht mit einem entsprechenden Mangelplasma gemischt, so daß nur die Faktoren der Probe selbst in die Bestimmung mit eingehen. Schließlich zeigt das Beispiel 2, daß bei Zugabe von exogenem APC mit dem Verfahren nach Amer et al. (1990) ein Protein C Mangel nicht erkannt wird, während dies in Beispiel 1 mit dem erfindungsgemäßen Verfahren der Fall ist.

Aus der Sicht der Hämostaseologie drohen dem Organismus zwei Gefahren, durch die das Blut seine Funktion als Organ verlieren kann: zum einen der Blutverlust, zum anderen die intravasale Gerinnung. Dementsprechend stellt die Diagnostik Verfahren zur Detektion von Blutungsneigungen und Verfahren zur Detektion von Gerinnungsneigungen zur Verfügung. Das erfindungsgemäße Verfahren - zum Nachweis von Störungen des Protein C/Protein S-Systems - gehört zu der Klasse der Nachweis-verfahren zur Detektion einer Gerinnungsneigung. Überraschenderweise basiert das erfindungsgemäße Verfahren jedoch auf einer Modifikation eines Standardverfahrens zur Detektion von Blutungsneigungen, der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (APTT). Als Oberflächenaktivatoren der Kontakphase des Gerinnungssystems können alle dem Stand der Technik entsprechenden Materialien, wie beispielsweise Kaolin, Silica, Glas oder Ellagsäure verwendet werden.

Die Aktivierung des Protein C der Probe erfolgt proteolytisch mit einem geeigneten Enzym. Bevorzugt sind solche Enzyme, die keine anderen Faktoren des Gerinnungssystems - außer Protein C - aktivieren oder anderweitig beeinflussen. Besonders bevorzugt sind daher Protein C-Aktivatoren aus dem Gift von Schlangen, wie beispielsweise *Agkistrodon contortrix contortrix*, *Agkistrodon bilineatus* oder *Agkistrodon halys halys*.

Die Konzentration des Protein C-Aktivators wird dabei so gewählt, daß in Verbindung mit der Einwirkdauer auf die Protein C Aktivierung (Inkubationszeit) im Test eine geeignete Verlängerung der Gerinnungszeit im Plasma erzeugt wird. Geeignet ist eine Verlängerung der Gerinnungszeit gegenüber der Gerinnungszeit ohne Anwesenheit eines Protein C-Aktivators, die aufgrund des verwendeten Gerätetypus signifikante Abweichungen von normalen Plasmen erkennen läßt. Bevorzugterweise beträgt die Verlängerung mindestens 30 %, besonders bevorzugterweise mindestens 100 %, ganz besonders bevorzugterweise mindestens 200 %.

Es ist auch denkbar, daß das Protein C in der Probe vollständig durch vorhergehende Inkubation mit einem Protein C-Aktivator aktiviert wird. Dann muß allerdings die Probe entsprechend verdünnt werden oder es dürfen nur geringe Probenmengen verwendet werden, damit die Probe noch gerinnbar bleibt.

Benötigt der verwendete Protein C-Aktivator keine Phospholipide zur Aktivierung von Protein C, kann die Inkubation von Oberflächenaktivator, Probe und Protein C-Aktivator auch in Abwesenheit von Phospholipiden erfolgen und diese erst später zugesetzt werden. Die Reihenfolge der Zugabe von Oberflächenaktivator, Probe, Protein C-Aktivator und gegebenenfalls Phospholipiden kann variiert werden. Bevorzugt ist daher ein Reagenz, das eine aktivierende Oberfläche, Phospholipide und einen Protein C Aktivator enthält (siehe Beispiel 3). Besonders bevorzugt ist als weiterer Zusatz in einem Reagenz ein chromogenes Substrat für Thrombin, so daß die Bestimmung der Gerinnungszeit auch chromogen erfolgen kann (siehe Beispiel 4).

Weiterhin ist eine Kombination mit zusätzlichen Reagenzien möglich, die eine genauere Spezifikation des gefundenen Defekts erlauben. So kann im Fall eines Verdachts auf Protein C Mangel oder Defekt die Probe mit einer Protein C-haltigen Lösung gemischt werden. War ein Protein C Mangel oder Defekt tatsächlich die Ursache für eine abnorm verkürzte Gerinnungszeit im erfindungsgemäßen Verfahren, so wird sie durch den Zusatz neutralisiert (siehe Beispiel 5). Entsprechend kann Protein S bei Verdacht auf Protein S Mangel oder Defekt, Faktor V (F.V) oder eine Faktor V angereicherte Lösung bei Verdacht auf abnormen Faktor V bzw. Phospholipide zur Neutralisierung inhibitorischer Antikörper ("Lupus anticoagulant") zugesetzt werden. Bevorzugterweise werden diese Zusätze in einer solchen Menge zugegeben, daß in dem Testansatz jeweils die funktionelle Menge der jeweiligen Zusatzkomponente vorhanden ist, die sich auch mit einem Normalplasma ergeben würde. Diese Zusätze werden sinnvollerweise vor Zugabe des Protein C-Aktivators gegeben. Bevorzugt ist eine vorherige Inkubation der Zusätze mit der Probe. Besonders bevorzugt ist eine solche Vorinkubation bei Zugabe von Phospholipiden zur Neutralisierung von inhibitorischen Antikörpern.

Da die Methode auf einer Modifikation einer Standardmethode zur Erkennung einer Blutungsgefahr beruht, können neben der APTT auch andere gängige Gerinnungsmethoden verwendet werden, wie die Thromboplastin-Zeit (PT; siehe Beispiel 6) oder die 'Russell's Viper Venom Time' (RVVT; siehe Beispiel 7). Die Thromboplastin Zeit beruht auf der Verwendung eines Reagenzes, das neben Phospholipiden und Calciumchlorid Gewebefaktor (Thromboplastin; 'tissue factor') enthält, der den sogenannten extrinsischen Weg der Gerinnung aktiviert. Bei der RVVT wird Schlangengift, bevorzugt der Spezies *Vipera russellii*, verwendet um die Gerinnungsfaktoren Faktor X und V zu aktivieren, die dann direkt ohne weitere Zwischenschritte Thrombin aus Prothrombin erzeugen. Bei beiden Methoden wird die Faktor VIII-abhängige Gerinnungskaskade umgangen. Schwankungen der Konzentration an Faktor VIII haben in der APTT den stärksten Einfluß auf das Ergebnis, da zum einen der Faktor VIII als Cofaktor die Gerinnungsvorgänge um ca. den Faktor 1000 beschleunigt und zum anderen die Faktor VIII-Konzentrationen in Patienten gemeinhin stark schwanken können. Die Anwendung einer PT oder RVVT gegenüber der APTT resultiert somit in einer spezifischere Methode, die weniger von den prokoagulatorischen Faktoren, als vielmehr nur noch von den Faktoren des Protein C/Protein S-Systems abhängig ist (Beispiel 8).

Die folgenden Beispiele sollen lediglich die Erfindung erläutern, jedoch die Ansprüche in keiner Weise einschränken.

Beispiel 1

Bestimmung der Gerinnungszeit unter Aktivierung des endogenen Protein C.

Die Bestimmung der Gerinnungszeit erfolgte an einem mechanischen Koagulometer nach Schnitger & Gross (Fa. Amelung). Alle Reagenzien waren Handelsprodukte der Fa. Behringwerke AG oder übliche Laborchemikalien. Folgende Proben wurden untersucht: ein Pool aus normalen Blutspendern (Standard-Human-Plasma), Protein C-Mangelplasma, Protein S-Mangelplasma und ein Plasma mit einem genetischen Defekt im Faktor V, so daß entstehender Faktor Va durch APC nur schlecht inaktiviert wird.

Eine Abfüllung Protein C-Aktivator für Berichrom® Protein C (enthält Protein C-Aktivator aus dem Gift von *Agkistrodon contortrix contortrix*) wurde in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Pathromtin®, ein Phospholipidgemisch aus humaner Plazenta, wurde in 5 ml Kaolinsuspension als Oberflächenaktivator gelöst. Die Calciumchloridlösung (25 mM) und die Protein C-Aktivatorlösung wurden vor Gebrauch auf +37°C erwärmt.

In ein Meßröhrchen wurden nacheinander pipettiert

- 100 µl Protein C-Aktivator-Lösung
- 100 µl Pathromtin®
- 100 µl Plasmaprobe.

Anschließend wurde bei +37°C für 2 Minuten inkubiert und durch Zugabe von 100 µl Calciumchlorid-Lösung die Gerinnungszeit gestartet. Gleichzeitig wurde eine eingebaute Stoppuhr eingeschaltet und die Zeit erfaßt, bis ein Gerinnsel detektiert wurde.

Weiterhin wurde die Gerinnungszeit der Proben ohne Aktivierung von Protein C, d.h. bei Zugabe von 100 µl physiologischer Kochsalzlösung anstelle der Protein C-Aktivator Lösung bestimmt.

In Tabelle 1 sind die erhaltenen Gerinnungszeiten (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen) zusammengefaßt. Mit einem Pool von Citrat-Plasmen normaler Blutspender (SHP) wurden Gerinnungszeiten von ca. 42 sec. ohne und von 145 sec. mit PC-Aktivator erhalten. Diese durch die Aktivität des Protein C/Protein S-System erzielte Verlängerung von ca. 103 sec., war in den Proben, die einen Protein C- (PC-MP) oder Protein S-Mangel (PS-MP) aufwiesen, deutlich geringer. Auch das Plasma mit einem mutierten Faktor V (F.V-D) zeigte eine deutlich geringere Verlängerung der Gerinnungszeit.

Tabelle 1: Gerinnungszeiten in Ab- und Anwesenheit eines Protein C-Aktivators zur Aktivierung des endogenen Protein C in verschiedenen Plasmen mit Defekten im Protein C/Protein S System. Angaben in Sekunden. SHP = Standard-Human-Plasma, PC-MP = Protein C-Mangelplasma, PS-MP = Protein S-Mangelplasma, F.V-D = Faktor V Gendefekt.

		SHP	PC-MP	PS-MP	F.V-D
ohne	PC-Aktivator	41,6	43,2	57,1	41,6
mit	PC-Aktivator	45,0	46,6	120,3	76,7
	Verlängerung	103,4	3,4	63,2	35,1

Beispiel 2

Bestimmung der Gerinnungszeit in Anwesenheit von exogenem Protein C.

Die Bestimmung der Gerinnungszeit erfolgte an einem mechanischen Koagulometer nach Schnitger & Gross (Fa. Amelung). Alle Reagenzien waren Handelsprodukte der Fa. Behringwerke AG oder übliche Laborchemikalien. Die Proben entsprechen denjenigen aus Beispiel 1.

Eine Abfüllung APC-Reagenz für APC-Sensitivitäts-Reagenzien (enthält humanes, aktiviertes Protein C und Calciumchlorid) wurde in 5 ml Aqua dest. gelöst. Pathromtin® diente wie Unter Beispiel 1 als Oberflächenaktivator und Phospholipidgemisch. Das APC-Reagenz wurde vor Gebrauch auf +37°C erwärmt.

In ein Meßröhrchen wurden nacheinander pipettiert

100 µl Pathromtin®

100 µl Plasmaprobe.

Anschließend wurde bei +37°C für 2 Minuten inkubiert und durch Zugabe von 100 µl APC-Reagenz die Gerinnungszeit gestartet. Gleichzeitig wurde eine eingebaute Stoppuhr eingeschaltet und die Zeit erfaßt, bis ein Gerinnsel detektiert wurde.

Weiterhin wurde die Gerinnungszeit der Proben ohne Aktivierung von Protein C, d.h. bei Zugabe von 100 µl Calciumchlorid-Lösung anstelle von APC-Reagenz bestimmt.

In Tabelle 2 sind die erhaltenen Gerinnungszeiten (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen) zusammengefaßt. Mit einem Pool von Citrat-Plasmen normaler Blutspender (SHP) wurden Gerinnungszeiten von ca. 37 sec. ohne und von ca. 170 sec. in Anwesenheit von exogen zugeführten APC erhalten. Diese damit erzielte Verlängerung von ca. 133 sec. war in dem Plasma Protein S-Mangel (PS-MP), besonders aber in dem Plasma mit einem mutierten Faktor V (F.V-D) deutlich geringer. Hingegen wurde in diesem Verfahren in Gegensatz zum erfindungsgemäßen Verfahren ein Protein C

Mangel nicht erkannt. Im Gegenteil, aufgrund des leichten Faktorenmangels, erkennbar an der etwas verlängerten APTT (= Gerinnungszeit ohne APC), wurde die Gerinnungszeit in Anwesenheit von APC noch deutlich über die des SHP. hinaus verlängert. Dieses Verfahren ist im Gegensatz zum erfindungsgemäßen Verfahren nicht geeignet alle Defekte des Protein C/Protein S-Systems zu erkennen.

Tabelle 2: Gerinnungszeiten in Ab- und Anwesenheit von exogen zugefügtem, aktivierten Protein C in verschiedenen Plasmen mit Defekten im Protein C/Protein S-System.

Angaben in Sekunden. SHP = Standard-Human-Plasma, PC-MP = Protein C-Mangelplasma, PS-MP = Protein S-Mangelplasma, F.V-D = Faktor V Gendefekt.

	SHP	PC-MP	PS-MP	F.V-D
ohne APC	36,8	41,9	64,9	35,7
mit APC	169,6	298,0	108,2	54,5
Verlängerung	132,8	256,1	43,3	18,8

Beispiel 3

Bestimmung der Gerinnungszeit unter Aktivierung des endogenen Protein C bei Verwendung eines Monoreagenzes.

Die Bestimmung der Gerinnungszeit erfolgte an einem mechanischen Koagulometer nach Schnitger & Gross (Fa. Amelung). Alle Reagenzien waren von der Fa. Behringwerke AG. Erweiterend zu den Proben entsprechend aus Beispiel 1 wurden ein Faktor V-Mangelplasma (F.V-MP) und ein Faktor VIII-Mangelplasma (F.VIII-MP) mit untersucht.

Zwei Abfüllungen Protein C-Aktivator für Berichrom® Protein C wurden in je 2,5 ml Kaolinsuspension gelöst. Diese Lösungen (5 ml) wurden ihrerseits zum Lösen von 1 Abfüllung Pathromtin® verwendet. Dieses Monoreagenz enthält somit Phospholipide, Kaolin als Oberflächenaktivator und einen Aktivator für Protein C. Die Calciumchloridlösung (25 mM) und das Monoreagenz wurden vor Gebrauch auf +37°C erwärmt.

In ein Meßröhrchen wurden nacheinander pipettiert

100 µl Monoreagenz

100 µl Plasmaprobe

Anschließend wurde bei +37°C für 2 Minuten inkubiert und durch Zugabe von 100 µl Calciumchlorid-Lösung die Gerinnungszeit gestartet. Gleichzeitig wurde eine eingebaute Stoppuhr eingeschaltet und die Zeit erfaßt bis ein Gerinnsel detektiert wurde.

Weiterhin wurde die Gerinnungszeit der Proben ohne Aktivierung von Protein C, d.h. bei Verwendung des kommerziellen Pathromtin® bestimmt.

In Tabelle 3 sind die Gerinnungszeiten (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen) zusammengefaßt, die mit den verschiedenen Plasmen erhalten wurden. Mit einem Pool von Citrat-Plasmen normaler Blutspender (SHP) wurden Gerinnungszeiten von 37,6 sec. ohne und von 131,7 sec. mit PC-Aktivator im APTT-Reagenz erhalten. Analog zu den in Beispiel 1 aufgeführten Ergebnissen waren die Verlängerungen der Gerinnungszeit in einem Protein C- (PC-MP), einem Protein S-Mangel (PS-MP) oder in einem Plasma mit einem mutierten Faktor V (F.V-D) deutlich geringer. Dieses Beispiel zeigt auch, daß ein Mangel von Faktoren, der primär nicht mit dem Protein C/Protein S System, sondern mit der Thrombingerierung zusammenhängt, etwa ein Faktor V- oder ein Faktor VIII-Mangel, in Anwesenheit eines Protein C Aktivators nicht zu einer Verkürzung, sondern im Gegenteil zu einer Verlängerung der Gerinnungszeit führt. Diese Plasmen

sind dann nicht mehr gerinnbar, d.h. die Messung wurde nach 300 sec abgebrochen (">300" in Tabelle 3).

Tabelle 3: Gerinnungszeiten in verschiedenen Plasmen bei Verwendung eines APTT-Reagenzes ohne (Pathromtin®) und mit einem Protein C-Aktivator (Monoreagenz).

Angaben in Sekunden. SHP = Standard-Human-Plasma, PC-MP = Protein C-Mangelplasma, PS-MP = Protein S-Mangelplasma, F.V-MP = Faktor V-Mangelplasma, F.VIII-MP = Faktor VIII-Mangelplasma, F.V-D = Faktor V Gendefekt.

	SHP	PC-MP	PS-MP	F.V-D	F.V-MP	F.VIII-MP
Pathromtin®	37,6	42,2	54,2	35,6	>300	88,6
Monoreagenz	131,7	42,5	79,4	47,8	>300	>300
Verlängerung	94,1	0,3	25,2	12,2	-	-

Beispiel 4

Bestimmung der Gerinnungszeit unter Aktivierung des endogenen Protein C bei Verwendung eines chromogenen Substrats für Thrombin.

Die Bestimmung der Gerinnungszeit erfolgte an einem Behring Coagulation Timer (BCT; Fa. Behringwerke), einem photometrischen Koagulometer. Alle Reagenzien waren von der Fa. Behringwerke AG. Die Proben entsprechen denjenigen aus Beispiel 1.

Eine Abfüllung Protein C-Aktivator für Berichrom® Protein C wurde in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Als APTT-Aktivatorreagenz wurde Pathromtin® SL verwendet. Dies ist eine Suspension von Phospholipiden aus Sojabohnen mit Silica-Partikeln als Oberflächenaktivator. Als Startreagenz wurde ein Gemisch aus Calciumchloridlösung (25 mM) und 0,2 mM BCP-100, ein chromogenes Thrombin-Substrat, verwendet.

Die Pipettierung wurde vom Gerät selbständig durchgeführt. Das Startreagenz und die Protein C-Aktivatorlösung werden vom Gerät direkt vor Gebrauch auf +37°C erwärmt.

In eine Meßküvette wurden nacheinander pipettiert

70 µl Pathromtin® SL

10 µl Protein C-Aktivator bzw. nur physiologische Kochsalzlösung

70 µl Probe

Anschließend wurde bei +37°C für 2 Minuten inkubiert und durch Zugabe von 70 µl Startreagenz die Messung gestartet. Es wurde die Zeit registriert, zu der eine Zunahme der Extinktion von 0,3 bei 405 nm erreicht wurde.

In Tabelle 4 sind die erhaltenen Zeiten mit den verschiedenen Plasmen aufgeführt. Analog zu der klassischen Gerinnungsmethode (Erfassung der Bildung eines Fibringerinnsels) werden auch bei Verwendung eines chromogenen Substrats alle Plasmen mit einer Störung im Protein C/Protein S System gegenüber einem normalen Plasma Pool verkürzt

gefunden.

Tabelle 4: Chromogene Bestimmung der Thrombinentstehung mit und ohne Aktivierung des endogenen Protein C bei Plasmen mit verschiedenen Störungen im Protein C/Protein S System.

Angaben in Sekunden bis eine Extinktionszunahme von 0,300 bei 405 nm auftrat. SHP = Standard-Human-Plasma, PC-MP = Protein C-Mangelplasma, PS-MP = Protein S-Mangelplasma, F.V-D = Faktor V Gendefekt.

	SHP	PC-MP	PS-MP	F.V-D
ohne PC-Aktivator	73,9	95,1	95,6	73,4
mit PC-Aktivator	111,3	100,2	120,6	91,4
Verlängerung	37,4	5,1	25,0	18,0

Beispiel 5

Identifizierung eines Defekts im Protein C/Protein S System durch Modifikation des Screening Verfahrens.

Wie unter Beispiel 3 und in Beispiel 4 beschrieben wurde die Gerinnungszeit einmal durch Erfassung der Gerinnungselbstbildung mit einem Monoreagenz bzw. durch Erfassung der Thrombinbildung in einem getrennten Ansatz bestimmt. Dieser Screening-Test eignet sich auch zur Differentialdiagnostik. Dazu wurden die in Beispiel 3 und 4 aufgeführten Ansätze wie folgt modifiziert. Als erster Schritt wurden 5 µl einer Protein C-haltigen Lösung pipettiert. Die Konzentration wurde so gewählt, daß die resultierende Protein C-Konzentration bezogen auf das Probenvolumen 1 Einheit betrug. Danach erfolgt die normale Zugabe von Probe und Reagenzien.

Aus Tabelle 5 geht hervor, daß mit verschiedenen methodischen Varianten des Bestimmungsverfahrens ein Protein C-Mangel eindeutig etwa gegen einen Protein S-Mangel zu differenzieren ist. Während der Zusatz von Protein C zu einem Protein C-Mangelplasma die Meßdifferenz der Ansätze mit und ohne Zugabe eines Protein C-Aktivators kompensierte, war dies bei einem Protein S-Mangelplasma nicht der Fall. Somit ist dieses Verfahren durch leichte Modifi-

katonen auch differentialdiagnostisch verwendbar.

Tabelle 5: Modifikation des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Differentialdiagnostik.

Proben mit von normalen Plasma abweichenden Differenzen der Gerinnungszeiten in Ab- und Anwesenheit eines Protein C Aktivators wurden mit 1 E Protein C pro ml Plasma versetzt und erneut die Gerinnungszeiten bestimmt. Die Bestimmung erfolgte zum einen traditionell mit einem Monoreagenz (A), zum anderen chromogen in einem mehrstufigen Verfahren (B).

Angaben in Sekunden. SHP = Standard-Human-Plasma, PC-MP = Protein C Mangelplasma, PS-MP = Protein S Mangelplasma.

(A) traditionelles Verfahren

	SHP	PC-MP ohne	+ 1 E PC	PS-MP ohne	+ 1 E PC
ohne PC-Aktivator	37,6	42,2	39,7	54,2	106,1
mit PC-Aktivator	131,7	42,5	143,4	79,4	117,0
Verlängerung	94,1	0,3	103,7	25,2	10,9

(B) chromogenes Verfahren

	SHP	PC-MP ohne	+ 1 E PC	PS-MP ohne	+ 1 E PC
ohne PC-Aktivator	73,9	85,3	93,3	95,6	96,3
mit PC-Aktivator	111,3	92,3	149,0	120,6	122,3
Verlängerung	37,4	7,0	55,7	25,0	26,0

Beispiel 6

Bestimmung der Gerinnungszeit unter Aktivierung des endogenen Protein C bei Anwendung der Thromboplastinzeit.

Die Bestimmung der Gerinnungszeit erfolgte an einem mechanischen Koagulometer nach Schnitger & Gross (Fa. Amelung). Alle Reagenzien waren von der Fa. Behringwerke AG.

Thromborel S[®], eine Gewebefaktor/Phospholipid-Präparation aus humaner Plazenta, wurde 1:1000 in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4, 0,01% Phospholipon-25, verdünnt. 5 ml dieser Lösung wurden verwendet um 1 Abfüllung Protein C-Aktivator für Berichrom Protein C, wie in Beispiel 3 beschrieben zu lösen.

Diese Lösung wurde vor Gebrauch auf +37°C erwärmt und anstelle des Monoreagenzes auf APTT-Basis, wie in Beispiel 3 beschrieben, verwendet.

Weiterhin wurde die Gerinnungszeit der Proben ohne Aktivierung von Protein C, d.h. bei Verwendung des kommerziellen Pathromtin[®] bestimmt.

In Tabelle 6 sind die Gerinnungszeiten (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen) zusammengefaßt, die mit den verschiedenen Plasmen erhalten wurden. Analog zu den in Beispiel 1 aufgeführten Ergebnissen waren die Verlängerungen der Gerinnungszeit in einem Protein C- (PC-MP), einem Protein S-Mangel (PS-MP) oder in einem Plasma mit einem

mutierten Faktor V (F.V-D) deutlich geringer.

Tabelle 6: Gerinnungszeiten in verschiedenen Plasmen bei Verwendung eines PT-Reagenzes (Thromborel S®) mit einem Protein C-Aktivator (Monoreagenz).

Angaben in Sekunden. SHP = Standard-Human-Plasma, PC-MP = Protein C-Mangelplasma, PS-MP = Protein S-Mangelplasma,, F.V-D = Faktor V Gendefekt.

SHP	PC-MP	PS-MP	F.V-D
103,6	49,6	54,5	69,9

Beispiel 7

Bestimmung der Gerinnungszeit unter Aktivierung des endogenen Protein C bei Anwendung der RVVT.

Die Bestimmung der Gerinnungszeit erfolgte an einem Behring Coagulation Timer (BCT; Fa. Behringwerke), einem photometrischen Koagulometer. Als RVVT-Reagenz wurde LA-Confirm, der Fa. Gradiopore LTD (North Ryde, NSW, Australien) verwendet. Alle sonstigen Reagenzien waren von der Fa. Behringwerke AG. Die Proben entsprechen denjenigen aus Beispiel 1.

Eine Abfüllung Protein C-Aktivator für Berichrom® Protein C wurde in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Das RVVT-Reagenz wurde nach Vorschrift gelöst. Alle Reagenzien wurden vor Gebrauch durch das Gerät auf +37°C gebracht.

In eine Meßküvette wurden nacheinander pipettiert

50 µl Probe

50 µl Protein C-Aktivator bzw. nur physiologische Kochsalzlösung Anschließend wurde bei +37°C für 2 Minuten inkubiert und durch Zugabe von 100 µl RVVT-Reagenz die Messung gestartet. Es wurde die Zeit registriert, zu der eine Zunahme der Extinktion von 0,3 bei 405 nm erreicht wurde.

In Tabelle 7 sind die erhaltenen Zeiten mit den verschiedenen Plasmen aufgeführt. Analog zu den sonstigen klassischen Gerinnungsmethoden (APTT, PT) werden auch bei Verwendung eines RVVT-Reagenzes alle Plasmen mit einer Störung im Protein C/Protein S System gegenüber einem normalen Plasma Pool verkürzt gefunden.

Tabelle 7: Gerinnungszeiten in verschiedenen Plasmen bei Verwendung eines RVVT-Reagenzes nach Inkubation der Probe in Anwesenheit bzw. ohne Zusatz eines Protein C-Aktivators.

Angaben in Sekunden. SHP = Standard-Human-Plasma, PC-MP = Protein C-Mangelplasma, PS-MP = Protein S-Mangelplasma,, F.V-D = Faktor V Gendefekt.

	SHP	PC-MP	PS-MP	F.V-D
ohne PC-Aktivator	43,6	44,8	49,4	43,4
mit PC-Aktivator	125,6	49,1	74,1	61,3

Beispiel 8

Abhängigkeit der Bestimmung von Faktor VIII bei Verwendung der APTT bzw. der PT unter Aktivierung des endogenen Protein C

Ein Standardhumanplasma wurde mit einem Faktor VIII-Mangelplasma gemischt bzw. Beriate®, ein Faktor VIII-Konzentrat (Behringwerke AG) zugegeben, um den Einfluß von Faktor VIII auf die Bestimmung der Gerinnungszeit nach Aktivierung des endogenen Protein C zu simulieren. Die Bestimmung unter Anwendung einer APTT erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben, die Bestimmung mittels einer PT erfolgte wie in Beispiel 6 beschrieben.

In Tabelle 8 sind die Gerinnungszeiten aufgeführt, die basierend auf einer APTT bzw. PT erhalten wurden. Es ist zu sehen, daß die unerwünschte Störung von Faktor VIII bei der Evaluierung der Funktionalität des Protein C-Systems bei der APTT deutlich ist, während sie in der PT-basierenden Methode praktisch nicht auftritt.

Tabelle 8

Gerinnungszeiten in Abhängigkeit von der Faktor VIII-Konzentration bei Verwendung eines APTT bzw. eines PT-Reagenzes nach Inkubation der Probe mit einem Protein C-Aktivator. (Angaben in sec.)		
Faktor VIII (E/ml)	APTT	PT
0,25	206	114
0,5	147	111
1,0	96	104
1,5	79	102
2,0	65	109
3,0	60	107
4,0	54	107

Patentansprüche

1. Verfahren zum qualitativen Nachweis und zur quantitativen Bestimmung der funktionellen Aktivität des Protein C/Protein S-System der Gerinnung in einer Probe einer biologischen Flüssigkeit, das folgende Schritte einschließt:
 - a) Zugabe eines Aktivators des Protein C zu der verdünnten oder unverdünnten Probe;
 - b) optionale Zugabe eines Kontakphaseaktivators;
 - c) Inkubation des Reaktionsansatzes;
 - d) Start des Gerinnungsablaufes durch Zugabe von Kalziumionen und/oder anderen Gerinnungs-auslösenden Agenzien und
 - e) Bestimmung der Gerinnungsaktivität.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Protein C Aktivator aus der Gruppe der Protein C Aktivatoren ausgesucht wird, die überwiegend oder ausschließlich Protein C aktivieren, bevorzugterweise aus der Gruppe der Schlangengiftenzyme, besonders bevorzugterweise das Gift der Gattung *Agkistrodon*.
3. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1-2, wobei es sich bei den Reagenzien zur Aktivierung von Gerinnungsfaktoren bzw. den Gerinnungsverfahren zur Detektion von Blutungsneigungen um die Bestimmung der aktivierten, partiellen Thromboplastinzeit (APTT), der Thromboplastin-Zeit (PT) oder der Russell's Viper Venom Zeit (RVVT) handelt.
4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 - 3, wobei der Kontakphaseaktivator ausgewählt wird aus der Gruppe die Kaolin, Silica, Glas und Ellagsäure umfaßt.
5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 - 4, wobei mindestens die Inkubation in Schritt c) bei kontrollierten Temperaturen abläuft, bevorzugterweise bei 36 - 38 °C.

6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 - 5, wobei die Konzentration des Protein C Aktivators so eingestellt wird, daß die Gerinnungszeit für ein Normalplasma um mindestens 30 %, bevorzugterweise mindestens 100 %, ganz bevorzugterweise mindestens 200 % verlängert wird.
- 5 7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 - 6, wobei die Inkubationsdauer in Schritt c) so eingestellt wird, daß die Gerinnungszeit für ein Normalplasma um mindestens 30 %, bevorzugterweise mindestens 100 %, ganz bevorzugterweise mindestens 200 % verlängert wird.
8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 - 7, wobei zwischen Schritt a) und b) eine weitere Inkubation erfolgt
- 10 9. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 - 8, wobei
 - i) die Zugabe eines Aktivators des Protein C,
 - 15 ii) die Zugabe eines Kontakphasenaktivators und
 - iii) der Start der Gerinnungsablaufs durch Zugabe von Calciumionengleichzeitig oder in kurzen Zeitabständen nacheinander erfolgt.
- 20 10. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 - 9, wobei in Schritt e) ein chromogenes Substrat zur Bestimmung der Gerinnungsaktivität verwendet wird.
11. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 - 10, wobei dem Ansatz vor Schritt c) Phospholipide hinzugefügt werden
- 25 12. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 - 10, wobei dem Ansatz nach Schritt c) Phospholipide hinzugefügt werden
13. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 11 und 12, wobei die Phospholipide aus der Gruppe der Phospholipide ausgewählt werden die die Anlagerung von Enzym/Kofaktor Komplexen an die entstehenden Oberflächen bewirken.
- 30 14. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 - 13, wobei in Schritt e) die Zeit bis zur Entstehung eines durch mechanische mechano-optische oder turbidimetrische Meßmethoden detektierbares Gerinnsel zur Bestimmung der Gerinnungsaktivität verwendet wird.
- 35 15. Verfahren nach Anspruch 10, wobei in Schritt e) die Umsetzung eines chromogenen Substrats für Thrombin zur photometrischen Bestimmung der Gerinnungsaktivität verwendet wird.
- 40 16. Mittel zur Verwendung in einem Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 - 9, wobei das Reagenz den Protein C Aktivator, den Kontakphaseaktivator und Phospholipide in einer in der in vitro Diagnostik üblichen Zubereitung enthält.
17. Testkit zur Verwendung in einem Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 -15, das mindestens ein Mittel
- 45 nach Anspruch 16 enthält
18. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 - 3, wobei in einem der Schritte a) bis e) weitere Komponenten zugegeben werden, die geeignet sind, endogene Defizite im Protein C/ Protein S System auszugleichen.
- 50 19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei die weiteren Komponenten ausgewählt sind aus der Gruppe: Protein C, Protein S, Faktor V oder Phospholipide.
20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die eingesetzten Proteine bevorzugterweise humanen Ursprungs sind.
- 55 21. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die eingesetzten Proteine bevorzugterweise tierischen Ursprungs sind.
22. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 18-21, wobei die Konzentration der weiteren Komponenten so gewählt ist, daß sie in geeigneter Mischung mit der Probe eine Störung des Protein C/Protein S-Systems aufgrund eines Mangels oder Defekts an diesen weiteren Komponenten ausgleichen.

23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei die Konzentration der weiteren Komponenten so gewählt ist, daß nach Mischung in der Probe diejenige funktionelle Stoffmenge vorhanden ist, die in einem normalen Plasma zu finden ist.
24. Verfahren nach Anspruch 22, wobei die weitere Komponente Faktor V ist und die Konzentration an Faktor V so gewählt ist, daß nach Mischung in der Probe ein mindestens zweifacher Überschuß an der Menge von funktionellem Faktor V vorhanden ist, die in einem normalen Plasma zu finden ist.
25. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 18-24, wobei die Mischung der Probe mit der oder den weiteren Komponenten vor Zugabe des Protein C Aktivators erfolgt, bevorzugterweise wird die Probe mit der oder den Zusatzkomponenten vor Zugabe des Protein C Aktivators für eine Zeit von 1-10 min inkubiert.
26. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1-3, wobei auf einen Kontakthase-Aktivator verzichtet wird und die Gerinnung auf Basis der Thromboplastin-Zeit mit Reagenzien ausgelöst werden kann, die Gewebefaktor und Phospholipide beinhalten.
27. Verfahren nach Anspruch 26, wobei der Gewebefaktor natürlichen oder rekombinanten Ursprungs sein kann.
28. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 26 und 27, wobei das Gewebefaktor-haltige Reagenz bereits einen Protein C-Aktivator enthält oder die Zugabe des Gewebefaktor getrennt von der Zugabe des Protein C-Aktivators erfolgt.
29. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1-3, wobei auf einen Kontakthase-Aktivator verzichtet wird und die Gerinnung auf Basis der RVVT mit Reagenzien durchgeführt wird, die Faktor X und Faktor V aktivierende Faktoren aus Schlangengift und Phospholipide beinhalten.
30. Verfahren nach Anspruch 29, wobei die Faktor X und Faktor V aktivierenden Faktoren gereinigt oder durch Zugabe von unfraktioniertem Schlangengift dem Reagenz zugesetzt werden.
31. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 29 und 30, wobei das Faktor X und Faktor V aktivierende Faktoren-haltige Reagenz bereits einen Protein C-Aktivator enthält oder die Zugabe der Faktor X und Faktor V aktivierenden Faktoren getrennt von der Zugabe des Protein C-Aktivators erfolgt.



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			EP 95111554.2
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (inkl. C6)
A	WO - A - 93/10 262 (BAXTER DIAGNOSTICS INC.) * Zusammenfassung; Ansprüche *	1-10	C 12 Q 1/56
A	EP - A - 0 406 971 (INSTRUMENTATION LABORATORY S.P.A.) * Zusammenfassung; Ansprüche *	1-10	
A	EP - A - 0 236 985 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) * Zusammenfassung; Ansprüche *	1-10, 29, 30	
A	WO - A - 91/01 382 (KABIVITRUM AB) * Zusammenfassung; Ansprüche 1-9 *	1-10	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (inkl. C6)
			C 12 Q
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort WIEN		Abschlußdatum der Recherche 12-10-1995	Prüfer SCHNASS
<p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</p> <p>E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			

EP Form 1503 03/92